

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

**Evaluación bacteriológica de semen de verracos
aparentemente sanos según el sistema de crianza
semitecnificada y tecnificada**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Lidia Beatriz CONZA BLANCO

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2002

*Dedico esta tesis a mis queridos padres, Justino y Julia,
quienes me apoyaron en todo momento de mi carrera,
gracias por todo su amor y por su confianza.*

*Agradezco a mis hermanas, Miriam y Gladys,
a mi tía Estefanía, a Martín, quienes me
brindaron su apoyo en todo momento.*

*A mi Directora de tesis la Dra. Sonia Calle
y a la Dra .María Cerón, por su colaboración
y dedicación a que culminara con éxito mi
tesis.*

*A mis asesores el Dr. Néstor Falcón,
Dra. Hermelinda Rivera. A la Dra. Luisa
Echevarría,, Dr. Raúl Zegarra, quienes
colaboraron conmigo durante el desarrollo
de mi trabajo, gracias por su valiosa ayuda.*

*El agradecimiento a todos aquellos que de alguna
manera contribuyeron a la culminación de mi
carrera profesional, A mis maestros de la Facultad
de Medicina Veterinaria de la Universidad
Nacional Mayor de San Marcos; por todas sus
enseñanzas y experiencias transmitidas, muchas
gracias.*

CONTENIDO

RESUMEN	ix
SUMMARY	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE APENDICE	xiii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Características Seminales	4
2.3 Inseminación Artificial	5
2.4 Contaminación del Semen	7
2.5 Microorganismos presentes en el semen	8
2.6 Efectos de la contaminación bacteriana sobre la fertilidad	10
2.7 Enfermedades que se pueden transmitir a través del semen ..	12

III. MATERIALES Y METODOS	13
3.1 Lugar de estudio	13
3.2 Animales	13
3.3 Colección de semen	14
3.4 Análisis bacteriológico del semen	15
3.4.1 Análisis cualitativo	15
3.4.2 Análisis cuantitativo	15
3.5 Análisis de datos	16
IV. RESULTADOS	18
V. DISCUSION	20
VI. CONCLUSIONES	24
VII. RECOMENDACIONES	25
VIII. LITERATURA CITADA	26

RESUMEN

Semen de verracos aparentemente sanos provenientes de granjas de crianza tecnificada y semitecnificada fueron evaluados bacteriológicamente, con el objetivo de investigar la cantidad y tipo de microorganismos presentes en el semen, analizándose 60 muestras de semen extraídas de 30 verracos, procedentes de 3 granjas porcinas de Lima, 2 granjas de crianza tecnificada y una semitecnificada. Cada muestra de semen fue sembrada en medios de cultivo y las muestras que tuvieron desarrollo bacteriano, fueron identificados bioquímicamente.

En las muestras de granjas tecnificadas se encontró en el 73% de ellas (11/15) crecimiento bacteriano y los gérmes aislados según su frecuencia fueron *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter spp*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus spp.*

En las muestras de granjas semitecnificadas en el 100% de ellas (15/15) hubo crecimiento bacteriano, encontrándose *Pseudomona aeruginosa* con mayor incidencia y le siguieron *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella spp.* y *Citrobacter spp.*

En las granjas tecnificadas el 13% (2/15) de reproductores sobrepasaron el límite de unidades formadoras de colonias por mililitro de semen (UFC/ml) establecido por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (no >5103 UFC/ml) y en la semitecnificada el 60% (9/15) superaron estos límites.

Existen muchos factores que pueden actuar negativamente sobre la calidad espermática del semental provocando ciertas alteraciones cualitativas y cuantitativas que van a repercutir a corto plazo en una disminución de la eficiencia reproductiva del animal.

Palabras claves: semen, crecimiento bacteriano, crianza tecnificada, crianza semitecnificada, unidades formadoras de colonias, oficina internacional de epizootias.

SUMMARY

Semen of seemingly healthy hogs proceeding of farms of technique rearing and semitechnique rearing were evaluated bacteriologically with the aim to investigate the quantity and quality of present microorganisms in the semen, being analyzed 60 samples of semen extracted from 30 hogs, proceeding from 3 porcine farms of Lima, 2 farms of technique rearing and a semitechnique rearing. Every sample of semen was cultivated in means of culture and the samples that had bacterial development were identified biochemically.

In the samples of technique farms one found in 73 % of them (15/15) bacterial growth and the pathogens isolated according to its frequency was *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter spp*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus spp*. In the samples of semitechnique farms in 100 % of them (15/15) there was bacterial growth, being *Pseudomona aeruginosa* major effect and they followed *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella spp*. and *Citrobacter spp*.

In the farm technique 13% (2/15) of reproducers they surpassed the limit of units to form of colonies for milliliter of semen (UFC/ml) settled down by the international office of epizooties (OIE) (not >5103 UFC/ml) and in the semitechnique 60% (9/15) they overcame these limits.

Many factors that can act negatively about the spermatic quality of the hog causing certain qualitative and quantitative alterations that will reflect exist short term in a decrease of the reproductive efficiency of the animal.

Key words: semen, bacterial growth, technique rearing, semitechnique rearing, units to form of colonies, international office of epizooties.

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Frecuencia de reproductores con carga bacteriana en semen, distribuidos según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

CUADRO 2. Número UFC/ml de semen por reproductor según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

CUADRO 3. Número de reproductores afectados con valores > 5103 UFC/ml semen según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

CUADRO 4. Número de reproductores afectados por tipo y cantidad media de microorganismos, distribuidos según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

CUADRO 5. Distribución del número de reproductores afectados, cuantificando los tipos de bacterias encontradas.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Realización del lavado prepucial de un reproductor
- FIGURA 2.** Realización del secado del pene de un reproductor
- FIGURA 3.** Colección de semen en granja de crianza tecnificada utilizando el método de la mano enguantada
- FIGURA 4.** Colección de semen en granja de crianza semitecnificada

LISTA DE APENDICE

- APENDICE N. 1** Distribución de los tipos de bacterias encontradas por reproductor según grado de tecnificación de la granja.

I. INTRODUCCIÓN

En estos últimos años la inseminación artificial (IA) ha tomado auge en la especie porcina. El uso de la IA ha contribuido al mejoramiento genético como lo indican los parámetros reproductivos obtenidos, que son comparables e incluso superiores a los resultados de la monta natural. La IA también reduce las posibilidades de introducción de enfermedades a las explotaciones, a diferencia de la introducción de animales. Algunas otras ventajas de su uso incluyen una disminución del número de sementales necesarios en granja, facilita el manejo reproductivo al reducir el tiempo y el trabajo necesarios y un mejor control de la calidad del semen.

Por otro lado el desarrollo de esta tecnología hace que las hembras dependan en gran medida de un número limitado de sementales, siendo indispensable garantizar al máximo el "poder fecundante" de las dosis de semen producidas, ya que cualquier alteración reproductiva del semental no detectada a tiempo va a repercutir finalmente en pérdida de productividad a nivel de las explotaciones porcinas.

Está demostrado que la función reproductiva del semental está influenciada por diversos factores medioambientales, de manejo, nutricionales, sanitarios, etc.

Estos factores pueden actuar negativamente sobre la producción espermática del semental provocando ciertas alteraciones cualitativas y cuantitativas, que van a repercutir a corto plazo en una disminución de la eficiencia reproductiva del verraco.

Una de las causas más importantes de esta disminución es la producida por agentes infecciosos, siendo las pérdidas alrededor del 3 % debido a la calidad bacteriológica del semen. Principalmente en países donde la crianza de cerdos está altamente desarrollada, el aspecto reproductivo constituye uno de los principales aspectos sobre el cual giran los programas de mejoramiento animal.

La contaminación del semen puede representar un importante freno para el comercio internacional de reproductores. Así, la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), en las consideraciones generales del Código Zoosanitario Internacional señala que el objetivo del control sanitario oficial de la producción de semen son: mantener la salud de los animales de un centro de inseminación artificial ajustada a un nivel que permita la distribución internacional de semen con un riesgo mínimo de transmitir a otros animales o al hombre microorganismos patógenos específicos y asegurarse de que el semen sea tomado, tratado y almacenado higiénicamente (Oficina Internacional de Epizootias, 2001).

La temática de las impurezas bacterianas del semen, sigue siendo una preocupación de constante actualidad, lo cual es demostrado por numerosas publicaciones que se ocupan de este tópico. Esto demuestra la importancia del problema en el que influyen factores tales como el tipo y la cantidad de bacterias que dependen en gran medida de las condiciones zoosanitarias predominantes en las granjas porcinas. Por esta razón, el objetivo del presente estudio es evaluar bacteriológicamente la calidad del semen de verracos aparentemente sanos provenientes de granjas de crianza tecnificada y semitecnificada a fin de determinar que bacterias están involucradas en las mismas y si el tipo de crianza influye en su presencia.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

El semen es el resultante, en el momento de la eyaculación, de una mezcla de espermatozoides, producido en el testículo, con el plasma seminal, producto de las secreciones de las glándulas accesorias: vesículas seminales, glándulas uretrales, próstata y glándulas bulbouretrales o de cowper (Williams, 2000).

El verraco se caracteriza por tener un largo período de eyaculación, un elevado volumen seminal con gran proporción de material gelatinoso y baja concentración de células espermáticas, en comparación con otras especies domésticas, aunque posee un elevado número total de espermatozoides por eyaculado.

El semen de verraco está constituido por tres componentes: espermatozoides, líquido seminal (próstata, glándulas uretrales y vesículas seminales) y el material gelatinoso (glándulas bulbouretrales). El eyaculado se puede dividir en tres fracciones con bastante nitidez, durante los cuales se produce la emisión de los tres componentes del semen en diversas proporciones (Williams y col., 1992).

Las tres fracciones del semen porcino son: Fracción pre-espermática, que es eliminada al comienzo de la eyaculación y contiene algo de material gelatinoso,

líquidos seminales y pocos espermatozoides. La fracción espermática contiene el mayor número de espermatozoides procedentes de las contracciones que se producen en la cola del epidídimo. Representa el 30-40 % del eyaculado, aunque su volumen es variable dependiendo de los factores que influyen en la producción espermática. La última fracción es la post-espermática, con poca cantidad de espermatozoides, constituida principalmente por la secreción de la próstata y las glándulas de Cowper, sobretudo al final de esta fracción. Representa del 40-60 % del eyaculado.

La eyaculación se completa en 5 a 10 minutos, con una media de 8 minutos. Puede ser continua, excepto en un corto periodo de tiempo entre la primera y segunda fracción (Cameron, 1987).

2.2 CARACTERISTICAS SEMINALES

Motilidad: El rasgo más sobresaliente de los espermatozoides, es la motilidad y según Perestrelo (1983), es uno de los parámetros más ampliamente usados para evaluar la calidad del semen y se le considera un buen indicador de la viabilidad de los espermatozoides en general. Según Baker (1968), la motilidad del semen está relacionada con el momento de la observación, contenido de electrolitos, valores de pH y temperatura.

pH: Esta característica que constituye un aspecto bioquímico, varía ampliamente después de la colección y en orden al grado de desintegración del propio eyaculado. El pH del eyaculado depende de la resultante del valor pH de cada una de las fracciones líquidas que integran el volumen total colectado (Perestrelo, 1983). Una variación excesiva del pH, ya sea en sentido básico o ácido, denota variaciones metabólicas en los espermatozoides que pueden incidir seriamente en su poder fecundante (Cancellón, 1980).

El pH del semen del verraco según reportes varía de 6.5 hasta 8.0 (Osinowo, 1976). Según Cancellón (1980) la determinación del pH, da en general un pH entre 7.1 y 7.3.

Volumen: El verraco se caracteriza por tener una eyaculación de gran volumen de 150 a 500 cc e incluso puede llegar hasta 900 cc.

En general se ha reportado obtener volúmenes que varían desde 100 cc hasta 300 cc libre de la porción grumosa (Sorensen, 1979).

Según Valencia (1988) el eyaculado porcino tiene un volumen que varía de 150 a 300 ml (170 ml promedio).

Concentración: La concentración de espermatozoides en el esperma de un verraco es inferior, en 10 a 15 veces, al de un toro o un carnero. Sin embargo, es bastante grande y los espermatozoides se amontonan.

Se determina el número de espermatozoides por eyaculado, que junto con el dato del volumen, permite calcular el número de dosis inseminantes a preparar con la concentración deseada (Cancellón, 1980).

2.3 INSEMINACION ARTIFICIAL

La inseminación artificial (IA) de los animales, es uno de los logros más significativos de la biotecnología en la esfera de la producción pecuaria; constituye uno de los métodos más efectivos de lucha contra la infertilidad, subfertilidad y la difusión de las enfermedades por transmisión sexual (Orta, 1994). Dicha técnica se ha ido generalizando en la crianza y explotación porcina, propiciando un mayor impacto del mejoramiento genético de la masa porcina comercial (Diéguez, 1992)

Una de las mayores limitantes para el desarrollo de la inseminación artificial en los porcinos es la dificultad que existe en el proceso de conservación del material seminal por más de 24 horas. Algunas de las características de los eyaculados porcinos, como la fuerte dependencia de la motilidad espermática con la temperatura y la aglutinación espermática, influyen en forma negativa sobre las posibilidades de extender la aplicación comercial de la inseminación artificial con

semen conservado (Parrish, 1987). El eyaculado trifásico de cerdo presenta un efecto de aglutinación sobre los espermatozoides (Mann, 1981), más evidente en aquellos animales con fuerte libido. Esta última característica, altamente deseable, y especialmente en un centro de inseminación artificial, está limitada por la aglutinación. Los diluyentes de semen comerciales utilizados no han podido eliminar el problema en todos los reproductores (Johnson, 1988; Perestrelo, 1983; Revell, 1983; Ramírez, 1984).

Las prácticas comunes de conservación de semen en la producción de dosis de semen porcino para inseminación artificial incorporan un período de enfriamiento que permite llegar solamente a una temperatura constante de 16°C, ya que con semen enfriado a temperaturas menores de 16°C, no se han obtenido buenos resultados de inseminación (Johnson, 1981; Almlid, 1987).

El mantenimiento del semen a 16 - 17°C por 2-7 días, de acuerdo con los diferentes laboratorios productores de diluyentes seminales, presenta resultados variables, algunas veces contradictorios. Cuando se usa semen conservado a estas temperaturas y tiempo se requiere de mayor número de inseminaciones usando un mayor número de espermatozoides en cada inseminación y como consecuencia utilizando un mayor número de reproductores (Johnson, 1988; Perestrelo, 1983; Revell, 1989; Ramírez, 1984). Una serie de métodos se han desarrollado para incrementar el porcentaje de motilidad espermática de un eyaculado, como el «swim up», «clean up», y filtrados a través de diversas matrices, con resultados variables pero relativamente buenos (Broer, 1978; Lodhni, 1984; Parrish, 1987; Ciereszko, 1990; Drobnis, 1991)

Sumado a las dificultades propias del manejo del semen porcino para inseminación, diversos autores han planteado también una amplia gama de factores que provocan efectos desfavorables sobre la calidad del semen porcino, pudiendo estos tener su origen en el propio animal o ser la resultante de la interacción de éste con el ambiente. Entre estos figuran la contaminación del

semen por microorganismos y su contacto con el agua y los desinfectantes, los rayos solares directos y los cambios bruscos de temperatura (Fontanel, 1986).

2.4 CONTAMINACIÓN DEL SEMEN

La contaminación del semen puede ser de varios tipos y causada por varias fuentes como bacterias, virus, células sanguíneas, células epiteliales, orina; pero son las bacterias las contaminantes mas habituales.

La contaminación bacteriana del semen ocurre habitualmente durante la colecta y/o su dilución para la inseminación artificial. Los gérmenes comúnmente presentes en el eyaculado recolectado pueden ser adquiridos en su trayecto por el aparato genito-urinario (uretra distal, prepucio y su divertículo), o deberse a una infección en el tracto urogenital del macho; también por contaminación provocada por el contacto del semen con el aire que lo rodea o provenir de localizaciones diversas (piel del verraco, materia fecal, mano del operador, material de la colecta) (Arauz *et al.*, 2000). Fernández *et al.* 1998; comprobaron que los animales que recibieron mayor cantidad de extracciones semanales, presentaron también mayor contaminación bacteriana en el semen.

En la práctica, la contaminación bacteriana del semen se asocia con una reducción de la capacidad fecundante del espermatozoide (Mirjyn, 1999), por pérdida de motilidad, así como reducción en la fecundidad y muerte de embriones (Martínez *et al.* 1984).

Si la contaminación bacteriana es un problema de la explotación, es necesario identificar el género bacteriano contaminante con el fin de detectar el origen de esta contaminación en la granja y tratar de eliminarlo.

2.5 MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SEMEN

Bajo la mayoría de las circunstancias, las glándulas sexuales accesorias y los testículos del verraco deberían de estar libres de bacterias, pero cuando se realiza evaluaciones bacteriológicas de semen se encuentran algunas bacterias, que dependiendo del número y tipo se les ha considerado como un componente natural en el eyaculado del verraco (Althouse, 1999).

Lo que es claro es el hecho de que la contaminación bacteriana ocurre antes de la deposición del semen dentro de la cervix y útero de la marrana. Un informe indicó que virtualmente todas las muestras de semen se contaminan en el momento de la colección y las cargas bacterianas son más altas en determinados periodos del año (Almond 1994). Algunos trabajos plantean que estos contaminantes afectan la supervivencia de los espermatozoides, en lugar de infectar el útero de la marrana (Martín, 1994)

El examen bacteriológico en el semen es muy importante en la evaluación de éste, porque la baja fertilidad en hembras como en machos ha sido atribuida en ocasiones al semen con alto contenido de bacterias. Hay que tener mucho cuidado para interpretar los resultados bacteriológicos encontrados, puesto que es de gran importancia el número de microorganismos así como el tipo y virulencia de éstos (Mirjyn, 1999).

En cuanto a la cantidad de microorganismos presentes en el semen, se considera anormal cuando el conteo de bacterias excede las 10,000 unidades formadoras de colonias por mililitro de semen (UFC/ml) o cuando una bacteria específica logra sobrevivir en el semen. También sostiene que mas de 4000 colonias bacterianas contaminando al semen pueden matar algunos o todos los espermatozoides. El número de bacterias encontradas en el eyaculado puede variar de menos de 1000 UFC/ml. La infección microbiana puede resultar en una reducción

de la calidad del semen por la producción de semen anormal, maduración anormal de espermias y bloqueo de ductos (Mirjyn, 2000).

Según la OIE (2001), los recuentos de las colonias de bacterias (UFC/ml) presentes en el semen son valiosos indicadores de las normas de higiene observadas en el laboratorio de tratamiento del semen y el resultado del recuento no debe rebasar el siguiente valor 5103 UFC/ml.

Un estudio realizado en Argentina que consideró 41 muestras de semen porcino, encontró que el 61% de las mismas eran positivas al desarrollo bacteriano, considerando positivas aquellas muestras en las que encontraron desarrollo bacteriano superior a 10^4 UFC/ml y negativas aquellas que no presentaban desarrollo dentro de las 72 horas o el mismo era inferior a 10^3 UFC/ml (Arauz *et al*, 2000).

Los gérmenes normalmente presentes en el semen colectado pueden provenir de los testículos y glándulas anexas, prepucio y su divertículo, aparato urinario o de localizaciones diversas (piel del verraco, materias fecales, aerosoles, polvo, manos del operador y material de colecta). Esta flora seminal puede ser banal o potencialmente patógena: *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides*, *Bordetella Bronchiseptica*, *Brucella suis*, *Citrobacter*, *Corynebacterium suis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomona*, entre otros (Decuadro-Hansen, 1998).

Un estudio de la calidad de semen realizado en España reporta que la *Escherichia coli*, *Pseudomona spp.*, *Proteus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Alcaligenes faecalis* y *Klebsiella spp* fueron hallazgos de muestras prepuciales y sólo *Escherichia spp.*, *Pseudomona spp* y *Streptococcus spp* correspondieron a muestras también de semen (Martín, 1998).

Muchos trabajos de investigación llevados a cabo en diferentes partes del mundo concluyen que los géneros bacterianos aislados frecuentemente son diversos. Uno de ellos, que no reporta lugar de ejecución, encontró que en los eyaculados porcinos se encuentra principalmente *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, y *Proteus spp.* (Tamuli *et al.*, 1984) y otro, realizado en Alemania, reporta que los géneros bacterianos encontrados comúnmente en el semen porcino son: *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *E. Coli*, *Citrobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Neisseria spp.* y *Enterobacter spp.* (Danowski, 1989).

En general, la presencia o no de estas bacterias, dependerá de la higiene y el cuidado que se tenga al momento de la recolección del semen. Así mismo dependerá del grado de infección presente en la granja, la cual afectará la eficiencia reproductiva. El conocimiento de la presencia de las distintas cepas aisladas, conjuntamente con un antibiograma, permitirá realizar o elegir el tratamiento correcto en la solución de problemas infecciosos que afectan el tracto reproductivo, tanto de machos como de hembras y que repercuten en los resultados reproductivos de la granja (Serrano *et al.*, 1987). Sin embargo es importante tener en cuenta que la adición de antibióticos al diluyente no debe considerarse como una técnica rutinaria ni como un método primario de control de las contaminaciones en los eyaculados del verraco, el objetivo es tratar de que el verraco produzca un semen libre de bacterias a través de un manejo preventivo y de un continuo control sanitario llevado a cabo en la explotación porcina (Althouse, 1999).

2.6 EFECTOS POTENCIALES DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA SOBRE LA FERTILIDAD

Cuando los programas reproductivos pasan por un procedimiento en el que las hembras son inseminadas cuando no presentan un celo claro (por ejemplo, la inseminación durante algunos días después de la identificación del celo con un

verraco), las defensas naturales de las hembras se hallan, en esos momentos, muy limitadas y aparece un estado de inmunodepresión por lo que el útero es mucho más vulnerable a la infección.

Un estudio realizado en Estados Unidos, con el fin de demostrar los efectos del semen contaminado sobre el nivel sanitario del útero de las marranas, inseminaron con dosis de semen que contenía tres tipos de bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* y *Pseudomonas spp.*) a cerdas en el momento del celo y después de él. Los investigadores no se sorprendieron al observar varios días después tras la inseminación que no se detectaba ningún tipo de bacterias en el útero de las cerdas inseminadas cuando se hallaban en celo, presentando estas úteros normales a nivel de observación microscópica e histológica. En el caso de cerdas inseminadas con el semen contaminado cuando no estaban en celo, se pudo aislar con facilidad del útero, un gran número de cepas bacterianas, presentando la mayoría de estos úteros, procesos edematosos e incluso, algunos de ellos mostraban un estado piometral (Sone *et al.* 1989).

La presencia de microorganismos en el semen es un aspecto importante a tener en cuenta, ya que las dosis contaminadas pueden traer alteraciones como: disminución de la motilidad espermática y de acrosomas normales, presencia de aglutinaciones y la consecuente disminución de la capacidad fertilizante, diseminación de bacterias y virus, con la consecuente endometritis y descargas vaginales (Martín Rillo y col., 1998).

Así en general, las bacterias suelen presentar efectos negativos sobre los espermatozoides en el semen y lo que puede dar lugar a una reducción en la capacidad fertilizante del mismo. Debido a ello, debemos minimizar el efecto negativo de la contaminación bacteriana en el semen porcino (Althouse, 1999).

2.7 ENFERMEDADES QUE SE PUEDEN TRANSMITIR A TRAVES DEL SEMEN

Es importante saber que el semen puede ser un transmisor potencial de microorganismos patógenos para la hembra y no solo de etiología bacteriana, sino también viral. A pesar de existir un gran número de agentes infecciosos importantes que se han aislado de semen de verracos, muy pocas veces la inseminación artificial ha sido vista como causante o responsable de introducir enfermedades en rebaños porcinos. Sin embargo, la posibilidad de propagación de enfermedades a través de la distribución de semen por varias granjas es bastante grande (Sobestiansky, 2000); así por ejemplo en Francia fue comprobado que la utilización de semen de verracos provenientes de un centro de inseminación artificial con un status sanitario convencional sobre cerdas sin problemas sanitarios originó manifestaciones clínicas 24 horas después de haber practicado la IA (fiebre + 40,5 °C, anorexia y repetición de celo). El examen bacteriológico del semen reveló la presencia de *Serratia liquefaciens*, patógeno oportunista resistente al antibiótico utilizado en ese centro de inseminación (Decuadro-Hansen, 1998).

Ciertas bacterias presentan una importancia mayor debido a las manifestaciones clínicas asociadas a su presencia como *Brucella suis*, responsable de orquitis en el verraco o a su acción directa sobre los espermatozoides produciendo aglutinación (Smith, 1998).

Existen otros contaminantes eventualmente presentes en el semen como los Micoplasmas, (*hyopneumoniae*, *hyorhinis* y *verecundum*) y los Ureaplasmas; sin embargo no existe consenso general respecto a su presencia en el semen ya sea debido a la baja frecuencia de aislamientos realizados a partir de muestras de semen o a las dificultades prácticas para poner en evidencia estos agentes por cultivo microbiológico (Madec, 1989).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en 3 granjas porcinas; la primera localizada en el distrito de Lurín, la segunda en el kilómetro 66.5 de la Panamericana Sur, en el distrito de Chilca y la tercera en el Parque porcino, en el distrito de Ventanilla. Las dos primeras son de crianza tecnificada y la tercera de crianza semitecnificada.

3.2 ANIMALES

Se evaluó 30 reproductores machos provenientes de las 3 granjas, distribuidos de la siguiente manera:

- a. Granja N° 1: 7 verracos
- b. Granja N° 2: 8 verracos
- c. Granja N° 3: 15 verracos

La edad de los animales osciló entre los 9 meses hasta los 4 años. Se muestreó todos los reproductores machos que tenía cada granja.

3.3 COLECCIÓN DE SEMEN

Se utilizó el método de colección denominado "Gloved Hand" o "Mano enguantada"; usándose un brete para coleccionar el semen. El líquido espermático se recogió en un recipiente plástico en algunos casos y en un termo de colección en otros, provistos de una gasa en la boca para evitar que pase la fracción grumosa del semen u otros elementos contaminantes. Se realizaron dos colecciones de semen a cada verraco, con un intervalo aproximado de una semana entre ambas.

Se tomaron datos de los registros para cada macho, respecto a edad y raza. El protocolo de colección de semen fue el establecido por cada granja.

El trabajo consideró un total de 60 eyaculados porcinos, obtenidos de 30 sementales. Los muestreos se realizaron en los meses de Septiembre del 2000, Febrero y Noviembre del 2001. Las muestras obtenidas, en cantidad de 5 ml de semen puro y fresco, fueron envasados y transportados en frascos de vidrio estériles con tapa rosca. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos dentro de las 2-3 horas siguientes a la extracción y mantenidas a temperatura de refrigeración con el objetivo de evitar la multiplicación de los gérmenes.

3.4 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DEL SEMEN

3.4.1 Análisis Cualitativo

La determinación cualitativa de los microorganismos presentes en las muestras de semen, se realizó mediante la siembra en medios de cultivo como agar sangre, agar mac conkey, agar tripticasa soya, caldo tripticasa soya y agar Salmonella-Shigella; mantenidos a 37°C durante 48 horas. Las muestras para determinar microorganismos anaerobios fueron sembrados en agar sangre y mantenidos en estufa a 37°C durante 48 horas. Las muestras sembradas en agar sangre (5-10 %CO₂) fueron mantenidas a 37°C durante 7 días para comprobar el desarrollo de bacterias como *Brucella spp.*. Al cabo de los cuales se realizaron las lecturas respectivas. La identificación de los diferentes microorganismos cultivados se basó de acuerdo a las características morfológicas, culturales y propiedades bioquímicas.

La tipificación se realizó a través de la observación de la morfología de las colonias y de la realización de pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, coagulasa, TSI, Citrato, SIM, Nitrato, Lia, ureasa) para su identificación (Holt *et al.* 1994)

3.4.2 Análisis Cuantitativo

- Determinación del número de microorganismos:

El primer paso realizado con todas las muestras de semen fue el recuento de colonias en placa, para esto se recurrió a la técnica de recuento de microorganismos presentes en el semen recomendados en el código zoosanitario Internacional OIE-2001.

- Procedimiento:

Se tomó 1 ml de cada muestra y se procedió a diluirlo en 9 ml de agua peptonada tamponada estéril, una vez que se homogenizó la mezcla se tomó 1 ml de la primera dilución (10^{-1}) y se diluyó en 9 ml de agua peptonada tamponada estéril obteniendo así la segunda dilución (10^{-2}); así sucesivamente se llegó hasta una quinta dilución (10^{-5}).

Se depositó 0.5 ml de cada dilución en una placa petri estéril, añadiendo luego a cada placa 15 a 20 ml de agar para recuento de colonias (agar tripticasa soya). Se mezcló la placa con movimientos circulares y se dejó que solidificaran llevándolo posteriormente a incubar en la estufa a 37°C por 48 horas.

Cumplidas las 48 horas de incubación se procedió al recuento en placas, para realizarlo se seleccionaron las diluciones en las cuales hubo un desarrollo entre 30 y 300 colonias por placa (entre las cinco diluciones).

Una vez seleccionadas las placas se procedió al recuento de colonias mediante un contómetro y se tuvo el número exacto de colonias desarrolladas por placa, este número multiplicado por el factor de dilución nos dio el número de colonias encontradas por mililitro de la muestra original, según la técnica recomendada por la OIE, 2001.

3.5 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados son presentados en forma descriptiva en 5 cuadros resumiendo los resultados en porcentaje o medias aritméticas según sea el caso. Se determinó la asociación entre sistema de crianza versus condición de contaminación de la muestra y grado de tecnificación de la granja versus número de reproductores que sobrepasen los límites permitidos de UFC/ml de semen (no >5103 UFC/ml),

ambos mediante fisher exacto y odds rattoo para determinar factores de riesgo; además sistema de crianza versus cuantificación de tipos de bacterias que contaminan una muestra mediante la prueba de chi cuadrado.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó la presencia de bacterias en semen de verracos aparentemente sanos en granjas de crianza semitecnificada y tecnificada de Lima. Se encontró crecimiento bacteriano en muestras de semen independiente del sistema de crianza porcina de procedencia.

De las muestras provenientes de granjas tecnificadas, en el 73% (11/15) de ellas hubo crecimiento bacteriano y de las muestras provenientes de granjas semi tecnificadas, en el 100% (15/15) hubo crecimiento bacteriano (Cuadro 1). No hubo diferencia estadística significativa en la proporción de animales afectados por efecto del sistema de crianza de donde provinieron las muestras ($p>0.05$), ni tampoco constituye un factor de riesgo el grado de tecnificación de la granja (OR= 5.1 (0.5- 52.3).

Tomando como referencia los parámetros establecidos por la OIE de considerar hasta un máximo de 5103 UFC/ml semen, en este estudio se encontró que el 13% (2/15) de reproductores procedentes de granjas tecnificadas tuvieron una elevada carga bacteriana que sobrepasaron los límites permitidos por la OIE y en granjas de crianza semitecnificada el 60 % (9/15) de animales evaluados superaron los niveles permitidos. Se encontró diferencia estadística significativa en

la proporción de animales afectados con carga bacteriana mayores a 5103 UFC/ml semen por efecto del sistema de crianza ($p < 0.05$) y además constituye un factor de riesgo el grado de tecnificación de la granja para reproductores que sobrepasan los límites permitidos $OR = 9.8$ ($1.6 - 59.7$). El detalle de UFC/ml semen por reproductor y el número de reproductores afectados con valores > 5103 UFC/ml se muestran en los cuadros 2 y 3 respectivamente.

Del total de las muestras analizadas se encontraron 8 géneros diferentes de bacterias. De ellos, seis fueron comunes en las muestras provenientes de las granjas tecnificadas como la semitecnificada y diferían en un género entre ambas. En cuanto al tipo de bacterias encontradas, la *Pseudomona aeruginosa* es la bacteria que se encontró en mayor cantidad, habiendo superado los niveles permisibles establecidos por la OIE y la *Escherichia coli* fue la bacteria que se aisló en un mayor número de animales en ambos sistemas de crianza. Si bien la presencia de *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus* son indeseables en las muestras ya que son considerados agentes patógenos, su presencia estuvo dentro de los límites permitidos. No hubo crecimiento de microorganismos anaerobios y microaerófilos en las muestras, a excepción de aquellas bacterias que son aerobios y anaerobios facultativos a la vez. Además no se observó en ninguna de las muestras desarrollo de *Brucella spp.* El detalle de los géneros bacterianos encontrados y la cantidad media de bacterias encontradas por cada género se muestran en el Cuadro 4.

El estudio también encontró que como máximo tres tipos de bacterias contaminaban una muestra de semen. En la granjas tecnificadas, el mayor número de muestras eran contaminadas con un solo tipo de bacterias y en granjas semitecnificadas, lo eran con dos. No se encontró asociación entre el sistema de crianza y el número diferente de bacterias que contaminan una muestra. La distribución de las muestras contaminadas por tipos de bacterias se presenta en el Cuadro 5.

CUADRO 1. Frecuencia de reproductores con carga bacteriana en semen, distribuidos según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

Granja	Total	Contaminados	% ± I.C
Tecnificada	15	11	73 ± 22%
Semitecnificada	15	15	100 %
Total	30	26	87 ± 20%

No existe asociación ($p>0.05$).

OR= 5.1 (0.5-52.3)

Cuadro 2. N° UFC/ml de semen por reproductor según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

Granja Tecnificada		Granja Semitecnificada	
N° reproductores	UFC/ml	N° reproductores	UFC/ml
1	11380	1	26200
2	10000	2	20449
3	4330	3	19120
4	3740	4	16820
5	3515	5	15310
6	1200	6	7900
7	1084	7	6545
8	977	8	5675
9	706	9	5200
10	140	10	3325
11	40	11	1820
12	0	12	825
13	0	13	800
14	0	14	470
15	0	15	215

- OIE: No > 5103 UFC/ml

Cuadro 3. N° reproductores afectados con valores >5103 UFC/ml semen según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

Sist. Crianza	Total	> 5103 UFC/ml	% ± I.C
Tecnificada	15	2	13 ± 17%
Semitecnificada	15	9	60 ± 25%

Se encontró asociación ($p < 0.05$).

OR= 9.8 (1.6-59.7)

CUADRO 4. Número de reproductores afectados por tipo y cantidad media de microorganismos, distribuidos según grado de tecnificación de la granja de procedencia.

Microorganismos	Granja Tecnificada		Granja Semitecnificada	
	Nº cerdos	± UFC/ml	Nº cerdos	± UFC/ml
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	2/15	10145	5/15	12274
<i>Escherichia coli</i>	6/15	867	9/15	5650
<i>Proteus vulgaris</i>	2/15	1095	3/15	3468
<i>Staphylococcus aureus</i>	4/15	823	4/15	1045
<i>Citrobacter spp.</i>	2/15	2920	1/15	215
<i>Bacillus subtilis</i>	1/15	206	3/15	565
<i>Klebsiella spp.</i>	-----	-----	1/15	515
<i>Micrococcus spp.</i>	1/15	92	-----	-----

* OIE: No > 5103 UFC/ml

CUADRO 5. Distribución del número de reproductores afectados, cuantificando los tipos de bacterias encontradas.

Tipos de bacterias	Granja Tecnificada	Granja Semitecnificada
Negativo	4	0
1 tipo de bacteria	5	6
2 tipos de bacterias	5	7
3 tipos de bacterias	1	2
Total	15	15

No se encontró significancia ($p>0.05$).

FIGURA 1. REALIZACIÓN DE LAVADO PREPUCIAL



FIGURA 2. SECADO DEL PENE

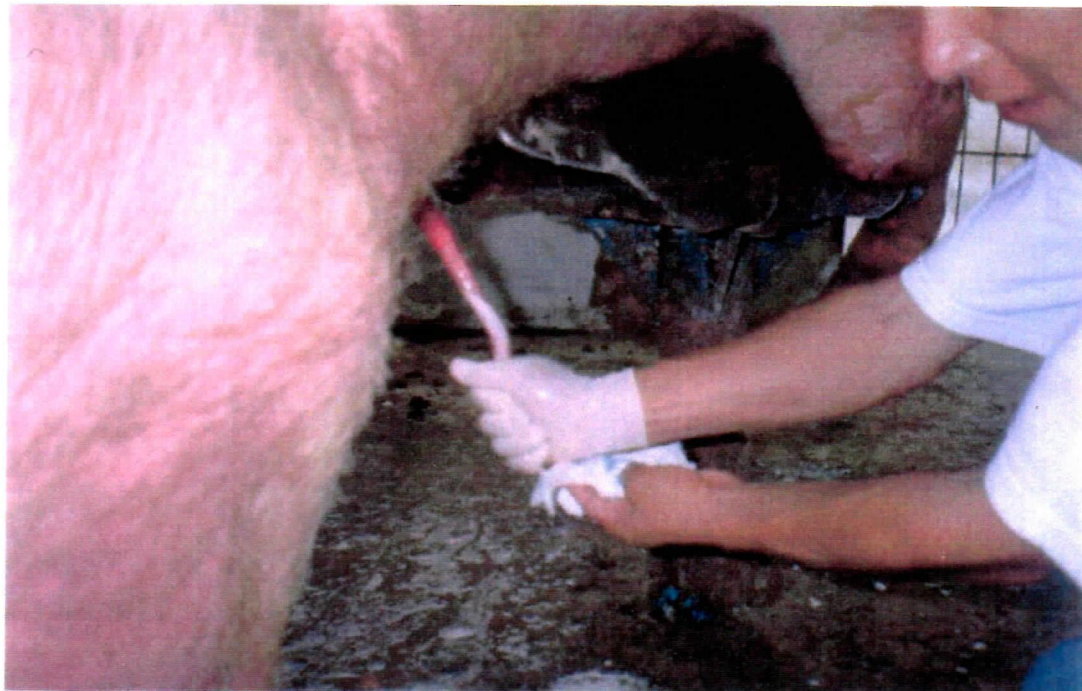


FIGURA 3. COLECCIÓN DE SEMEN EN GRANJA DE CRIANZA TECNIFICADA
Utilización del método de la mano enguantada



FIGURA 4. COLECCIÓN DE SEMEN EN GRANJA DE CRIANZA SEMITECNIFICADA.



V. DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos, del total de muestras evaluadas el 87% de las muestras (26/30) estuvieron contaminadas con microorganismos bacterianos (15 de granjas de crianza semitecnificada y 11 de tecnificadas). Aunque estadísticamente no se encontró diferencia significativa en la proporción de animales afectados según la procedencia de las mismas, la presencia de un alto porcentaje de muestras positivas procedente de granjas tecnificadas demostraría que este sistema de crianza no está siendo bien aplicado en la parte del manejo reproductivo de los reproductores.

Se debe considerar que los sistemas de crianza en cuestión difieren en cuanto a los niveles de bioseguridad establecidos por cada granja. Al respecto, en granjas tecnificadas existe un control sanitario obligatorio desde el ingreso a la granja, pasando por un vestuario con duchas y cambio total de la ropa y botas. En cuanto a la crianza semitecnificada ésta presenta muchas carencias en la aplicación de normas de bioseguridad que se reflejan en los resultados obtenidos.

Martínez *et al.* (1984), consideran que el grado de contaminación del semen es un indicador de la higiene y las condiciones de bioseguridad establecidos en cada granja y que los valores obtenidos debe tomarse en consideración como un reflejo

de las condiciones sanitarias de las granjas porcinas, en el cual se colecta y procesa el semen.

El contenido bacterial del semen está influenciado por las condiciones higiénicas de manejo que se le ofrece a los reproductores en el momento de la colecta del semen, así como las propias condiciones higiénicas de la sala de monta, la esterilidad de los materiales utilizados y las buenas prácticas de higiene del personal que están relacionados con todo el proceso de extracción y elaboración del material seminal (Kendrick *et al.*, 1975).

Estudios de contaminación de semen y sus efectos demuestran que existen una serie de microorganismos que se localizan en los órganos genitales de los reproductores y que ocasionalmente, llegan a provocar trastornos de la fertilidad, provocando una deficiente capacidad fecundante (Coraza, *et al.* 1990).

Respecto al tipo de microorganismos encontrados en los crecimientos bacterianos, se puede aseverar que la mayoría de las bacterias encontradas no dan lugar a enfermedades clínicas en el ganado porcino, pero en ciertas circunstancias como stress, inmunosupresión, inseminación cuando las marranas no están en celo, estas bacterias contaminantes pueden ser patógenas para los espermatozoides.

En ambos sistemas de explotación, la *Escherichia coli* fue la bacteria aislada en mayor número de cerdos y la *Pseudomona aeruginosa* en mayor cantidad (UFC/ml). Estos hallazgos son importantes debido a que estas bacterias han sido asociadas con alteraciones en la calidad del semen. Por ejemplo, existen estudios que han reconocido un efecto espermicida directo de la *E coli* y que esta podría ser la causa de la aglutinación espermática en el eyaculado, debido a que esta bacteria posee fimbrias con estructuras de naturaleza proteica denominadas lectina que se combinan con algunos carbohidratos presentes en la membrana

citoplasmática del espermatozoide, formando glicoproteínas que causan la aglutinación entre las células espermáticas (Althouse, 1999).

La presencia de la *Pseudomona* y su influencia sobre los espermatozoides y la fertilidad en la hembra se mantiene en debate. Existen estudios en los que se reporta pérdida de motilidad, reducción en la fecundidad y muerte de embriones por el uso de semen contaminado con *Pseudomona* (Martínez *et al.* 1984). Una fuente de contaminación puede ser el ambiente y no produce infertilidad a menos que el número de bacterias sea excesivo (Mirjyn, 1999).

La presencia de microorganismos coliformes y *proteus spp.* en el semen se sabe está relacionada con la contaminación fecal. La presencia de *E. coli* debe ser producto de falta de higiene en la manipulación del semen. Su presencia puede considerarse normal y no dañina (Wierzbowski, 1981) dependiendo de la cantidad existente ya que Osinowo y Salomón (1976) observaron infección de las glándulas sexuales accesorias en reproductores a causa de este microorganismo. La presencia de *Proteus spp.* son considerados justificables, debido a la humedad que generalmente presentan los pelos prepuciales; no obstante, Marinov en 1967, realizando estudios sobre la influencia de *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* en los espermatozoides obtuvo una acción espermicida que disminuía la supervivencia de los espermatozoides.

La presencia de *Staphylococcus aureus* puede provenir de diversas fuentes como el tracto reproductor del macho y producir lesiones en el tracto; sangre en el eyaculado e infertilidad del semental (Mirjyn, 1999).

El resultado de nuestro estudio respecto a los tipos de bacterias involucradas en la contaminación de semen como *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*; se encuentran entre los señalados por Sone

(1989), Tamuli et.al. (1984), Dagnall (1986) y Danowski (1989), los cuales también mostraron, básicamente, los mismos géneros bacterianos.

Además en ninguna de las muestras hubo crecimiento bacteriano de importancia reproductiva como *Brucella spp.* esto coincide con las investigaciones realizadas por otros autores donde tampoco encontraron *Brucella spp.*

El número de gérmenes presentes en las muestras de semen estudiadas es mucho más bajo que los resultados obtenidos por Sone 1990, que observó un crecimiento acelerado de gérmenes en el eyaculado, notando que el número promedio fue de 27,000 UFC/ml de semen fresco.

Existen pocos estudios similares al presente trabajo por lo que no se puede comparar el número de bacterias presentes en las muestras de semen, ya que estudios de otros países sólo se refieren generalmente al tipo de bacterias encontradas y orden de importancia, pero no considera el número de microorganismos hallados.

Los diferentes tipos de bacterias que contaminan una muestra no tiene ninguna significancia estadística, por lo que son independientes al sistema de crianza.

VI. CONCLUSIONES

- Se halló crecimiento bacteriano en muestras de semen de reproductores de crianza tecnificada y semitecnificada.
- El 73% de muestras (11/15) provenientes de granjas tecnificadas y el 100% (15/15) de granjas semitecnificadas tuvieron crecimiento bacteriano.
- En la granja tecnificada el 13% (2/15) de reproductores sobrepasaron el límite de UFC/ml de semen permisible establecido por la OIE (no >5103 UFC/ml) y en la semitecnificada el 60% (9/15) superaron estos límites.
- Se encontraron 8 géneros diferentes de bacterias en ambos sistemas de crianza.
- La especie *Pseudomona aeruginosa* fue la bacteria que se encontró en mayor cantidad (UFC/ml) y la *Escherichia coli* en un mayor número de animales, en ambos sistemas de crianza.
- El sistema de crianza si constituye un factor de riesgo para animales que sobrepasan los 5103 UFC/ml de semen

VII. RECOMENDACIONES

- La solicitud del análisis bacteriológico del eyaculado debe ser considerado como una práctica de rutina y asociarse con los demás datos de la evaluación seminal porcina.
- Realizar periódicamente lavados prepuciales, que consiste en la aplicación de solución desinfectante como peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3%, en las zonas genitales del verraco .
- La implementación de un protocolo de limpieza y sanidad del área, equipo y material de laboratorio debe ser aplicado en todas las granjas para reducir la carga microbiana en los eyaculados.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Almlid, T; Stavne SE and LA Johnson. 1987.** Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical AI conditions. *Zuchtig*. N° 22: 193-202.
2. **Almond, G; Britt, J; Carr, J; Flowers, W; Glossop, C; Morrow, M. y T. See. 1994.** The swine al book. A field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine. USA.
3. **Althouse, G. 1997.** Quality control strategies to enhance boar stud productivity and producers satisfaction. AASP swine reproduction workshop 10, AASP, Quebec.
4. **Althouse, G. 1999.** Orígenes y efectos de la contaminación microbiológica en el semen porcino conservado. VI Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Porcina. España. p 7-13
5. **Arauz, S; Stomelli, A. y S. Williams. 2000.** Estudio bacteriológico del semen porcino. Congreso Mercosur de Producción Porcina, 22 al 25 de Octubre de 2000,R7, Buenos Aires, Argentina.

6. **Broer KH, Dauber U. 1978.** A filtering method for cleaning up spermatozoa in cases of asthenospermia. *Int Journal of fertility* 23(3): 234-237.
7. **Baker, D; Dziuk, J y W. Norton. 1968.** Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. *Journal animal science*, No 27, USA, p 88-93
8. **Cameron, R.D.A. 1987.** Sexual development and semen production in boars. *Pig News and Infor.*, 8,1,p 389-396.
9. **Cancellón, A. 1980.** *Porcinocultura*. 5ª edición, C. G. Creaciones gráficas, S.A. España.
10. **Ciereszko, A; Jablonowska, CZ and K. Strzezek. 1990.** Aspartate aminotransferase activity in motile and immotile spermatozoa fractions of frozen thawed boar semen obtained after filtration on columns filled with chitin. *Animal Reproduction Science* 23: 237 - 244.
11. **Coraza, L; Bouza, R. Y H. Petrocelli. 1990.** Inseminación Artificial en cerdos. Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica de Uruguay. p 17.
12. **Dagnall, G. 1986.** An investigation of the bacterial flora of the preputial diverticulum and of the semen of boars. M. Ph. Thesis, Royal Veterinary College, Hertfordshire, England.
13. **Danowski, K. 1989.** Qualitative and quantitative investigation of the germ content in boar semen and the antibiotic sensitivity of the prevailing germ spectrum. Inaugural Diss. Hannover, Germany.

14. **Decuadro-Hansen, G. 1998.** Avances en inseminación artificial porcina. 1º Congreso Rioplatense de Producción Porcina. Uruguay.
15. **Del Aguila, J. 1976.** Estudio Bacteriológico del semen congelado y refrigerado de tres toros holstein usados en una central de inseminación artificial. Tesis para optar el título de Ingeniero Zootecnista. UNALM.
16. **Diéguez, J; Trujillo, G. e I. Santana.1992.** Utilización de las razas porcinas en Cuba. Revista ACPA. No. 2. Cuba. p 4-10.
17. **Drobnis, EZ; Zhong, CQ. and JW. Overstreet. 1991.** Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. J Androl 13 (3): 201-208. Journal Veterinary Argentina. Vol XVIII. N° 172.
18. **Fernández, A; Cruz, E; Lazo, L, Arredondo, C. y A. Brito. 1998.** Estudio Bacteriológico del semen de porcino. Valoración preliminar del efecto de la lectina de *Escherichia coli* en la aglutinación espermática.
<http://www.congresos.veterinaria.org>
19. **Fontanel, R. 1986.** Algunas consideraciones para la obtención de semen de verraco de buena calidad. Basics of semen collection. Pig. Intern.16 (8) p 22.
20. **Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J. y S. Williams. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Library of congress cataloging-in publication data. USA. p 175- 571
21. **Johnson, LA; Aalbers, JG, Willems, CMT y W. Sybesma. 1981.** Use of boar spermatozoa for artificial insemination. Farms. Journal Animal Science N° 52: 1130-1136.

22. **Johnson, LA; Aalbers, JG and HJ Grooten 1988.** Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthyg.* N° 23: 49-55.
23. **Kendrick, J; Harland, R; Bushned, B. and N. Kronlud. 1975.** Microbiologic contamination of bovine semen. *Theriogenology* 4: 125.
24. **Lodhi, LA; Crabo, BG. 1984.** Filtration of bulí spermatozoa through Sephadex, polyacrylamide silica gel and glass wool in the presence and absence of two sugars. *Procc. X International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Illinois, USA, p: 59-61.
25. **Madec, F; Vannier, P. 1989.** La contamination de la semence de verrat: risques encourus et règles á respecter. In: *Le point Vétérinaire*, vol. 21, No. 121.
26. **Mann, T; Lufnak-Mann, C. 1981.** Male reproductive function and semen. Vol. 2, ed. Springer Verlag, p 283.
27. **Marinov, P. 1967.** Influence de certains microorganisms sur l' activite de la deshydrase et l' activite vitale des spermatozoids. *Veterinarno Medicinski Nauki.* 4:65.
28. **Martín, J. 1994.** Infección del rebaño a través del semen. *Proceedings of Artificial Insemination of swine Workshop.* Shakespeare Community Centre, Shakespeare, Ontario, Canadá.
29. **Martín, S; Shokouki, V; Garcia, E, Hernández, R. y L. Romero. 1998.** "Contamination of semen dosis and its posible relationship with the

bacterial flora of the prepuce". Proceedings of the 15th IPVS Congress, England, 5-9 july, pp 60.

30. **Martínez, E; Peraza, N y P. García. 1984.** Evaluación Bacteriológica de semen bovino. I. Sementales de la raza holstein. Revista Cubana de Reproducción Animal. Vol. 10, N° 1.Cuba. p 7-15.
31. **Mirjyn, A. 1999.** Stimulation and detection of heat in gilts and sows, w/ flowers, tech. Report 12, NCSU.
32. **OIE- 2001.** Semen de Bovinos. Código Zoosanitario Internacional. Parte 3. Título 3.2. Anexo 3.2.1. <http://www.oie.int>
33. **Orta De la Loza, S. 1994.** Eficiencia reproductiva del ganado vacuno y ventajas técnico-económicas de la inseminación artificial sobre la monta natural. Revista ACPA. No. 1. Cuba. P 36-40.
34. **Osinowo, O. and S. Salomon.1976.** Examination of some processing methods for freezing boar semen. Australian Journal Biological Science. No. 29. p 325: 333.
35. **Parrish, JJ y RH Foote. 1987.**Quantification of bovine sperm separation by swin-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. Journal Androl N° 8: 259-266.
36. **Perestrelo, H. 1983.** Inseminação artificial porcina com sêmen fresco. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias. Vol. 78 (468). p: 255-276.

37. **Ramírez, R. 1984.** Evaluación de dos tipos de diluyentes para preservar el semen de cerdo en estado líquido. *Revista Veterinaria México*. 15:4.
38. **Revell, S. and CE Glossop. 1989.** A long life ambient temperature diluent for boar semen. *Animal Production*. N° 48: 579-584.
39. **Ruvalcaba, J; Lapuente, S; Corcuera, D; Sagüés, A. y S. Martín. 1998.** Evaluación práctica del semen. Importancia de los resultados de fertilidad. V Symposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial en porcinos. México. P 27-36.
40. **Serrano, G.; Fuentes, A.; Reguiro, C. y A. Valle. 1987.** Estudio de las anormalidades espermáticas de los verracos en relación a raza, tipo y época. *Zootecnia Tropical Venezuela*. Vol. XIV (1).
41. **Sierra, N. 1997.** Riesgo de PRRS en el manejo de semen porcino importado. *Boletín Asociación Peruana de Porcicultores*. Año 6, N° 54.
42. **Smith, A; Bouma, A. 1998.** The spread of classical swine fever via artificial insemination. In 10th European AI vets meeting, Belgium.
43. **Sobestiansky, J. y M. Pacheco. 2000.** Doencas transmissíveis via semen. VII Simpósio Internacional de reprodução e Inseminação Artificial em suínos. Anais simpósio. Brasil. p 295-309.
44. **Sone, M.; Kawarasaki, T.; Ogasa, A., et al. 1989.** Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 35; 159-164.

45. **Sone, M. 1990.** Investigation on the control of bacteria in boar sperm. *Japanesse Journal of animals reproduction*. Japan. vol. 36. p: 23-29.
46. **Sorensen, A. 1979.** Reproducción animal. Principios y prácticas. Edit. Mc Graw-Hill. USA. p 180.
47. **Tamulí, M; Sharma, D y C. Rajkonwar.1984.** Studies of the microbial flora of boar semen. *Indian Vet J.*61; p 858-861.
48. **Valencia,J; Galina, C. y A. Cohen. 1988.** Reproducción de animales domésticos. edit. Limusa S.A. México. p 177:189.
49. **Williams, S. 2000.** Parámetros de evaluación del semen. Conferencia expuesta en el VII Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial en Porcinos Foz de Iguazú- PR, Brasil.
50. **Williams, S; Marotta, E; Lagreca, L. y L. Vales. 1992.** Factores que afectan las características del semen del verraco. *Revista Veterinaria Argentina*, N° IX , 86, 401-410.
51. **Wierzbowski, S. 1981.** Bull semen opportunistic pathogen and ubiquitary microflora. Expert consultation on animal disease control in international movement of semen and embryos. FAO, Rome.